บทที่ 1

บทนำ

การแบ่งครึ่งเอมบริโอ เป็นเทคนิคที่เกี่ยวข้องกับการย้ายฝากเอมบริโออย่างใกล้ชิด เพราะจุดประสงค์ของการแบ่งครึ่งเอมบริโอในช่วงแรกคือ การพยายามที่จะเพิ่มจำนวนการผลิต เอมบริโอที่มีคุณสมบัติเป็นเลิศจำนวนมาก ๆ มาทำการย้ายฝากให้สัตว์ตัวรับ นอกเหนือจากการกระตุ้นให้แม่พันธุ์มีการตกไข่มากกว่าปกติโดยการใช้ฮอร์โมนโกนาโดโทรปินแล้ว การย้ายฝากเอมบริโอ เป็นวิธีการที่นิยมทั้งในอดีตและปัจจุบัน ทั้งนี้อาจเป็นเพราะว่าการย้ายฝากเอมบริโอนำผลประโยชน์มาสู่มนุษย์จำนวนมหาศาล เช่น ปรับปรุงพันธุ์สัตว์ ผลิตฝาแฝด เพิ่มผลผลิตสัตว์ รวมทั้งประหยัดค่าใช้จ่ายในการขนส่งสัตว์เป็นตัว การผ่าแบ่งเอมบริโอที่เก็บได้สามารถทำได้ตั้งแต่ระยะ 2 - 4- 8- 16- เซล ระยะมอรูล่า (morula) และระยะบลาสโตซิส (blastocyst) โดยอาจแบ่งเป็นสองส่วน สามส่วน หรือแบ่งเป็นสี่ส่วน การแบ่งครึ่งเอมบริโอได้เกิดขึ้นในครั้งแรกเป็นเวลาเกือบ 50 ปีมาแล้ว Tarkowski (1959) ได้ชี้ให้เห็นว่าแต่ละเซล ของเอมบริโอที่แยกจากเอมบริโอระยะสองเซลของหนู มีความสามารถที่จะเจริญเป็นเอมบริโอปกติ ซึ่งการเจริญนี้พบว่ามีความสัมพันธ์กับจำนวนเซล วิธีการและพื้นฐานดังกล่าวได้นำมาศึกษาในสัตว์เศรษฐกิจ เช่น แกะ แพะและโค เพื่อผลิตแฝดเหมือนเพศเดียวกัน (monozygotic twin) หรือ เพิ่มจำนวนลูกของสัตว์ที่ได้จากพ่อแม่พันธุ์ที่ดี จากการแยกเซลของเอมบริโอระยะ 2- 4- หรือ 8- เซล หรือระยะมอรูล่าจนถึงบลาสโตซิส (Willadsen, 1980 ; Willadsen and Polge, 1981; Willadsen et al., 1981; Ozil et al., 1982)

การแบ่งเอมบริโอเป็นที่สนใจกันอย่างกว้างขวางทั้งในอดีตและปัจจุบัน ซึ่งต้องการเทคนิคที่ง่ายเพื่อการปฏิบัติได้จริงในฟาร์ม นอกจากนี้ยังพบว่าการแบ่งครึ่งเอมบริโอสามารถเพิ่มจำนวนการย้ายฝากได้ เป็นสองเท่าของเอมบริโอที่หามาได้

เทคนิคนี้ใช้เป็นผลสำเร็จในเอมบริโอระยะมอรูล่าและบลาสโตซิสของโค (Ozil et al., 1982; Lambeth et al,1983) แพะ (Gatica et al., 1984) การแบ่งครึ่งเอมบริโอในระยะนี้ทำได้ง่ายขึ้นเนื่องจากไม่ต้องใส่ครึ่งเอมบริโอกลับคืน ในโซนาเพลลูซิดา เพราะ โซนาเพลลูซิดา ไม่มีความจำเป็นต่อการเจริญของเอมบริโอในระยะเหล่านี้แล้ว นอกจากนี้การย้ายฝากครึ่งเอมบริโอด้วยการมี โซนาเพลลูซิดา หรือไม่มีโซนาเพลลูซิดา ของโคในเอมบริโอทั้ง 2 ระยะนี้ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (Warfield et al.. 1987; Kippax et al. 1991; Szell and Hudson, 1991) ส่วนในด้านการเก็บเอมบริโอจากสัตว์ตัวให้และการย้ายฝากให้สัตว์ตัวรับ ยังสามารถกระทำได้ง่าย เพราะไม่ต้องผ่าตัดสัตว์ ดังนั้น เอมบริโอทั้ง 2 ระยะนี้จึงเป็นที่นิยมนำมาปฏิบัติ Kippax และคณะ (1991) ได้ศึกษาวิธีการ ย้ายฝากครึ่งเอมบริโอหลังการแบ่งเอมบริโอระยะมอรูล่าและบลาสโตซิสด้วยเข็มแก้วในโค โดยวิธีการผ่าและไม่ผ่าสัตว์ตัวรับ พบว่าได้อัตราการตั้งครรภ์ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในทั้ง 2 วิธี (60 และ 57 % ตามลำดับ) นอกจากนี้ยังได้ศึกษาเปรียบเทียบการแบ่งเอมบริโอด้วยเข็มแก้ว (microneedle) กับใบมีดเล็กๆ (microblade) ด้วย รายงานว่า ใบมีดใช้ได้ ง่ายและทำได้เร็วกว่าเข็มแก้ว แต่ผลที่ได้ออกมาเป็นลูกจากการทดลองไม่แตกต่างกัน (83 และ 85 %)

การค้นพบเทคนิค เพื่อการแบ่งเอมบริโอ ระยะมอรูล่าและบลาสโตซิสในโค (Ozil and Heyman,1982; Williams et al. 1982) ได้รับการสนับสนุนอย่างกว้างขวาง เนื่องจากทำได้ง่าย นอกจากนี้ พบว่าครึ่งเอมบริโอของทั้งสองระยะนี้มีโอกาสรอดชีวิตมากกว่าครึ่งเอมบริโอในระยะอ่อนกว่า เนื่องจากจำนวนของเซล ที่จะเปลี่ยน (differentiate) เป็น trophectoderm และ inner cell mass ที่ระยะ blastulation มีจำนวนมากเพียงพอ (Willadsen,1982) เซลของเอมบริโอ ของทั้ง 2 ระยะนี้จะยึดติดกันแน่นหนาตรงรอยต่อ (cell junction) เอมบริโอต้องถูกตัดให้เป็น 2 ส่วนด้วยการใช้ใบมีด (Baker and Shea, 1985) หรือใช้ เข็มแก้วปลายแหลม (Voelkel et al. 1984) มีการทดลอง 2-3 การทดลองที่รายงานถึงความเป็นไปได้ในการผลิตแฝดจากบลาสโตซิสระยะปลาย ๆ นั่นคือหลังการหลุดออกจาก โซนาเพลลูซิดา (hatched blastocysts)

Willadsen และ Godke (1984) ศึกษาในแกะ และ Tsunoda และคณะ (1985) ศึกษาในแพะ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า ได้แฝดจากการแบ่ง hatched blastocysts นั้นมีทางเป็นไปได้

การแบ่งเอมบริโอในระยะมอรูล่าและบลาสโตซิสได้ผลผลิตเป็นที่น่าพอใจในโคและสัตว์เคี้ยวเอื้องเล็ก ๆ เช่น แพะ แกะ(50-70% รอดชีวิต, 40-45%ได้แฝด) แต่อย่างไรก็ตามการศึกษาในสุกรยังมีน้อย Saito และคณะ (1991) ได้ศึกษาการเจริญของครึ่งเอมบริโอสุกรระยะ 8 เซล ระยะมอรูล่าและระยะบลาสโตซิสในหลอดทดลอง โดยแบ่งครึ่งเอมบริโอสุกรระยะ 8 เซล ระยะมอรูล่าและระยะบลาสโตซิสด้วยใบมีด จากนั้นได้นำแต่ละครึ่งใส่กลับคืนเข้าไปใน โซนาเพลลูซิดา เลี้ยงใน น้ำยาเพาะเลี้ยงชนิด modified Krebs-Riger bicarbonate solution (mKRB) +10% lamb serum นาน 24 ชม.จากการทดลองสรุปได้ว่า เอมบริโอระยะมอรูล่า และระยะบลาสโตซิส จะเป็นระยะที่เหมาะสมสำหรับการแบ่งเพื่อผลิตแฝดหรือเพิ่มผลผลิตเพราะอัตราการเจริญเป็นบลาสโตซิสหลังการแบ่งดีกว่าระยะ 8 เซล (57.5, 64.9 และ 65.6% ตามลำดับ)

Nagashima และคณะ (1989) ได้ศึกษาการแบ่งครึ่งเอมบริโอระยะมอรูล่าและระยะบลาสโตซิสด้วยเข็มแก้ว โดยก่อนการแบ่งเอมบริโอจะต้องมีการทำให้โซนาเพลลูซิดานิ่มด้วยการ incubate ใน 0.3% pronasec และตามด้วยการแยกเซล (decompaction) ด้วยการ incubate ในน้ำยา Hanks' banlanced salt solution (HBSS) หลังจากการแบ่งเอมบริโอระยะมอรูล่าออกเป็นสองส่วน นำครึ่งเอมบริโอแต่ละส่วนใส่คืน โซนา เพลลูซิดา ส่วนเอมบริโอระยะบลาสโตซิสจะแบ่งเป็นสองกลุ่มคือ กลุ่มแรกเตรียมคล้ายเอมบริโอระยะมอรูล่า ส่วนกลุ่มที่สองจะ incubate ใน 0.3% pronase เพียงอย่างเดียว จากนั้นทำการแบ่งเอมบริโอเป็นสองส่วนด้วยเข็มแก้ว แต่ละครึ่งของเอมบริโอไม่แยกกันโดยสมบูรณ์ (cell bridge) ในการทดลองจึงเลี้ยงครึ่งเอมบริโอเป็นคู่ ครึ่งเอมบริโอทั้งหมดเลี้ยงในน้ำยาเพาะเลี้ยงชนิด M-16 นาน 20 ชม. จากการทดลองพบว่า ได้ครึ่งเอมบริโอที่เจริญและรอดชีวิตเป็นบลาสโตซิสแบ่งตามเกรด I(excellent) II(fair) และ III(degenerated) ในระยะมอรูล่าเป็น 33.8%, 47.5%, 18.8% ตามลำดับ ส่วนบลาสโตซิสได้ครึ่งเอมบริโอที่เจริญและรอดชีวิตเป็นคู่แฝดเป็น 33.3% (เกรด I,I),

21.3% (เกรด I, II) และ25.3% (เกรด II, II) ในกลุ่มแรก ส่วนกลุ่มที่สองพบว่า ได้ครึ่งเอมบริโอที่เจริญและรอดชีวิตเป็นแฝด 45.7% (เกรด I,I), 23.9% (เกรด I,II) และ 23.9% (เกรด II,II) หลังการเลี้ยงในหลอดทดลองนาน 20 ชม. ก่อนการย้ายฝาก และสรุปว่าการแบ่งครึ่งเอมบริโอระยะบลาสโตซิสเป็นวิธีการที่สามารถผลิตแฝดเหมือนสุกรได้ดี

Ash และคณะ (1989) ศึกษาการผลิตแฝดเหมือนสุกร จากการแบ่งเอมบริโอระยะ 8 เซล มอรูล่าและบลาสโตซิส แบ่งเอมบริโอโดยใช้ใบมีดแทงจากด้านข้างถึงตรงกลางเอมบริโอ จากนั้นเปิ่นน้ำยาเพาะเลี้ยงเอมบริโอเข้าไปไล่เอมบริโอออกจากโซนาเพลลูซิดา จากนั้นใช้เข็มแก้วแบ่งเอมบริโอออกจากกัน หลังการแบ่งครึ่งแต่ละครึ่งของเอมบริโอจะใส่คืนใน โซนา เพลลูซิดา แล้วเลี้ยงในน้ำยาเพาะเลี้ยงกระทั่งทำการย้ายฝาก จากการทดลองพบว่าครึ่งเอมบริโอจากเอมบริโอระยะบลาสโตซิส หลังการย้ายฝากจะให้อัตราการรอดชีวิตดีกว่าระยะ 8 เซล และระยะมอรูล่า (32%, 7% และ 9% ตามลำดับ)

นอกจากนี้ Reichelt และ Niemann (1994) ได้ศึกษาการแบ่งเอมบริโอระยะมอรูล่าและระยะบลาสโตซิสโดยใช้ใบมีด หลังการแบ่งเอมบริโอ แต่ละครึ่งของเอมบริโอ จะเลี้ยง โดยไม่ใส่คืนโซนา เพลลูซิดา จากนั้นเลี้ยงครึ่งเอมบริโอในน้ำยาเพาะเลี้ยงชนิด mKRB นาน 24 ชม. ในการทดลองนี้ได้เปอร์เซ็นต์การย้ายฝากเป็นคู่ของครึ่งเอมบริโอในระยะบลาสโตซิสมากกว่าระยะมอรูล่า (71% และ 53%)

<u>เอมบริโอและการพัฒนาของเอมบริโอ</u>

ไข่ที่ผสมแล้วหรือเอมบริโอ (embryo) จะแบ่งตัว (cleavage) ต่อไป ตลอดระยะเวลาที่เคลื่อนผ่านท่อนำไข่ลงสู่มดลูก ขณะที่เอมบริโอแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเซลนั้นขนาดของเอมบริโอเท่าเดิม ดังนั้น แต่ละครั้งของการแบ่งตัว เซล (blastomere) จะมีขนาดเล็กลง ในไซโตพลาสสมของไข่มีส่วนประกอบสำคัญ ที่จำเป็นสำหรับกระบวนการแบ่งตัวจนถึงระยะ 2 เซลในหนูถีบจักร และประมาณ 4-8 เซลในมนุษย์และสัตว์

เลี้ยงในฟาร์ม ในระยะ 2 เซล ยีนส์ (gene) เริ่มเข้ามามีบทบาทส่ง เสริมการทำงานและการเจริญเติบโตของเอมบริโอ เมื่อพ้นระยะ 8 เซลในหนูหรือหลัง 16 เซลในสุกร เอมบริโอจะมีการเปลี่ยนแปลง ต่อไปเข้าสู่ระยะมอรูล่าและบลาสโตซิส ตามลำดับ

ระยะมอรูล่า หลังระยะ 16 เซลในสุกรเอมบริโอ เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างโดยเกิดกระบวนการ "compaction" เป็นเอมบริโอระยะมอรูล่า เพิ่ มความสามารถในการสังเคราะห์สารชีวโมเลกุล (biosynthetic capacity) มีการสังเคราะห์ RNA และโปรตีนเพิ่มขึ้น การส่งผ่านกรดอะมิโน (amino acid) และนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) เข้าสู่เซลเพิ่มขึ้น มีการเปลี่ยนเปลงรูปแบบการสังเคราะห์ ฟอสโฟไลปิด (phospholipid) และโคเลสเตอรอล (cholesterol)

ระหว่างกระบวนการ compaction นี้ เอมบริโอยังคงมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเซลมากขึ้น เซลกลมจะเปลี่ยนแปลงเป็นเซลรูปลิ่ม (wedge-shaped) ผิวหน้าเซลจะอยู่ชิดติดกันอย่างเหมาะเจาะ เซลที่อยู่ติดกันจะยึดติดกันด้วย tight junction ซึ่งเกิดขึ้นที่ผิวด้านนอกของเยื่อหุ้มเซล (outer membranes) ของแต่ละเซล เซลจะมีขั้วและนิวเคลียสของแต่ละเซลจะอยู่ด้านฐานของเซล (basal position) ต่อมาจะมีการเปลี่ยนเปลงรูปร่างอีกครั้งหนึ่ง จากระยะมอรูล่าเป็นระยะบลาสโตซิส (blastocyst)(Johnson and Everitt, 1988)

ระยะบลาสโตซิส เอมบริโอระยะนี้ จะมีเซล 2 ชนิดที่แตกต่างกันคือ ส่วนรอบนอกเรียกว่า trophectoderm cells ซึ่งล้อมรอบช่องว่างภายในเอมบริโอ (blastocoelic cavity) ที่มีของเหลว (blastocoelic fluid) อยู่ภายใน โดยที่เซลเหล่านี้จะเจริญเป็น chorionic ectoderm ซึ่งต่อมาจะพัฒนาเป็นเยื่อหุ้มทารก ชั้นนอก (chorion) และรก (placenta) อีกส่วนหนึ่งคือ inner cell mass ซึ่งเซลเหล่านี้จะรวมอยู่บนขั้วใดขั้วหนึ่งของเอมบริโอ (รูปที่ 1.1และ 1.2) เซลเหล่านี้จะเจริญเป็น extra-embryonic (extoderm mesoderm endoderm) และ embryonic(extoderm mesoderm endoderm) ซึ่งต่อมาจะพัฒนาเป็นเยื่อถุงน้ำคร่ำ (amnion) ถุงไข่แดง (yolk sac) เยื่อหุ้มทารก (allantois) และตัวอ่อน (fetus)

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมชนิดต่างๆ เอมบริโอใช้เวลาเคลื่อนที่ผ่านท่อนำไข่โดยเฉลี่ยประมาณ 3-4 วัน ภายหลังเกิดการปฏิสนธิ ส่วนสุกรพบว่า เอมบริโอจะอยู่ในท่อนำไข่ 3 วันจนถึงระยะ 4 เซล และจะเข้าสู่มดลูกพัฒนาเป็นเอมบริโอระยะมอรูล่าและบลาสโตซิส ซึ่งจะเกิดประมาณวันที่ 5-6 หลังการผสม (รูปที่ 1.3) เอมบริโอที่เคลื่อนที่ลงสู่มดลูกโดยส่วนใหญ่จะอยู่ในระยะมอรูล่าหรือระยะบลาสโตซิส (Blandau,1961) ส่วนระยะเวลาการฝังตัวของเอมบริโอ (implantation) จะไม่เท่ากันขึ้นกับชนิดของสัตว์ (Whittingham, 1979) Johnson และ Everitt (1988) แสดงการเจริญของเอมบริโอในแต่ละ species ไว้ตามตารางที่ 1.1

<u>การเลี้ยงเอมบริโอนอกร่างกาย</u>

การนำเอมบริโอออกมาจากท่อนำไข่หรือมดลูก แล้วนำมาเลี้ยงนอกร่างกายสัตว์ เป็นวิธีการเพื่อศึกษาถึงการเจริญเติบโตของเอมบริโอ ระยะต่าง ๆ ความต้องการสารอาหาร การศึกษาผลต่าง ๆ ของสารเคมี ยา ที่มีผลกระทบต่อการเจริญเติบโต รวมทั้งเป็นตัวบ่งชี้ถึงความสำคัญสำเร็จหรือความล้มเหลวหลังการใช้เทคโนโลยีชีวภาพอื่นๆ กับเอมบริโออาทิ เช่น การแบ่งครึ่งเอมบริโอ การถ่ายฝากยีนส์ การปฏิสนธิภายนอกร่างกายเป็นต้น นอกจากนี้วิธีการเลี้ยงเอมบริโอยังใช้ประโยชน์ในการขนส่งเอมบริโอจากสถานที่แห่งหนึ่งไปยังสถานที่อีกแห่งหนึ่งได้

การเจริญเติบโตของเอมบริโอในสัตว์แต่ละชนิดขึ้นอยู่กับสารคัดหลั่ง (secretion) ของท่อนำไข่และมดลูกที่ประกอบด้วยสารชีวเคมี,เกลือ,แร่ธาตุ และไอออน (Restall and Wales, 1966; Wales, 1973) สภาพแวดล้อมดังกล่าวสามารถสร้างให้เกิดขึ้นภายนอกร่างกาย ได้มีผู้ทำการศึกษาและได้รับความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงเอมบริโอระยะก่อนฝังตัวในหลอดทดลอง (in vitro) จากไข่ที่ได้รับการปฏิสนธิแล้ว ถึงระยะบลาสโตซิส เช่น ในหนูถีบจักร (Whittingham and Biggers,1967) กระต่าย (Maurer et al., 1969) มนุษย์ (Steptoe et al., 1971) แกะ (Tervit et al., 1972) โค (Wright et al.,1976) การเจริญเติบโตดังกล่าวถือว่าเหมือนกับการเจริญในโพรงมดลูก ทั้งนี้

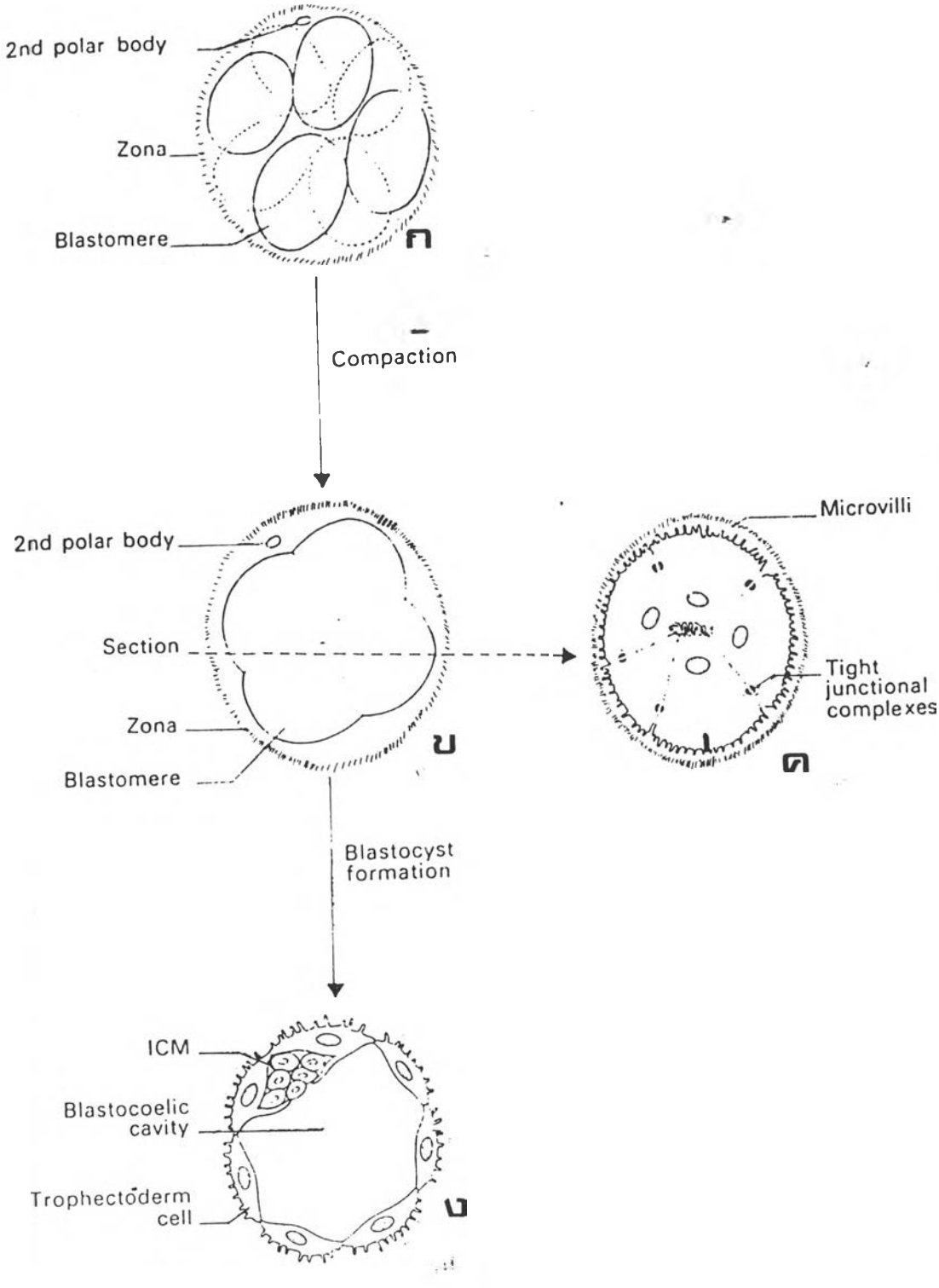
ตารางที่1.1 แสดงระยะเวลา (วัน) หลังการตกไข่ซึ่งแสดงพัฒนาการของเอมบริโอในสัตว์ species ต่างๆ (Johnson and Everitt, 1988)

ชนิดสัตว์	การแบ่งตัวเป็นระยะ 4 เซล	เอมบริโอเข้าสู่มดลูก	ระยะบลาสโตซิส	เวลาในการเริ่มฝังตัว	การฝ่อของเซลลูเตียล	ระยะเวลาการอุ้มท้อง
การฝังตัวแบบ Invasive						
หนูเมาส์	1.5-2	3	3	4.5	10-21	21
หนูแรท	2-3	3	4.5	4.5-5.5	10-12	22
กระต่าย	1-1.5	3.5	3.5	7-8	12	28-30
มนุษย์	2	3.5	4	6(?)	12-14	270
การฝังตัวแบบ Non-invasive						
แกะ	4	2-4	6-7	16	16-18	145-150
สุกร	1-3	2-4	5-6	18	16-18	114
โค	2-3	3-4	7-8	30-45	18-20	282
ม้า	1.5-2	4-5	6	30-40	20-21	340

เพราะเมื่อนำเอมบริโอ ที่เพาะเลี้ยงภายนอกร่างกาย ใส่กลับสู่โพรงมดลูกของเพศเมียที่ตั้งท้องเทียม (pseudopregnancy) แล้ว สามารถฝังตัวและเจริญเติบโตได้ตามปกติ

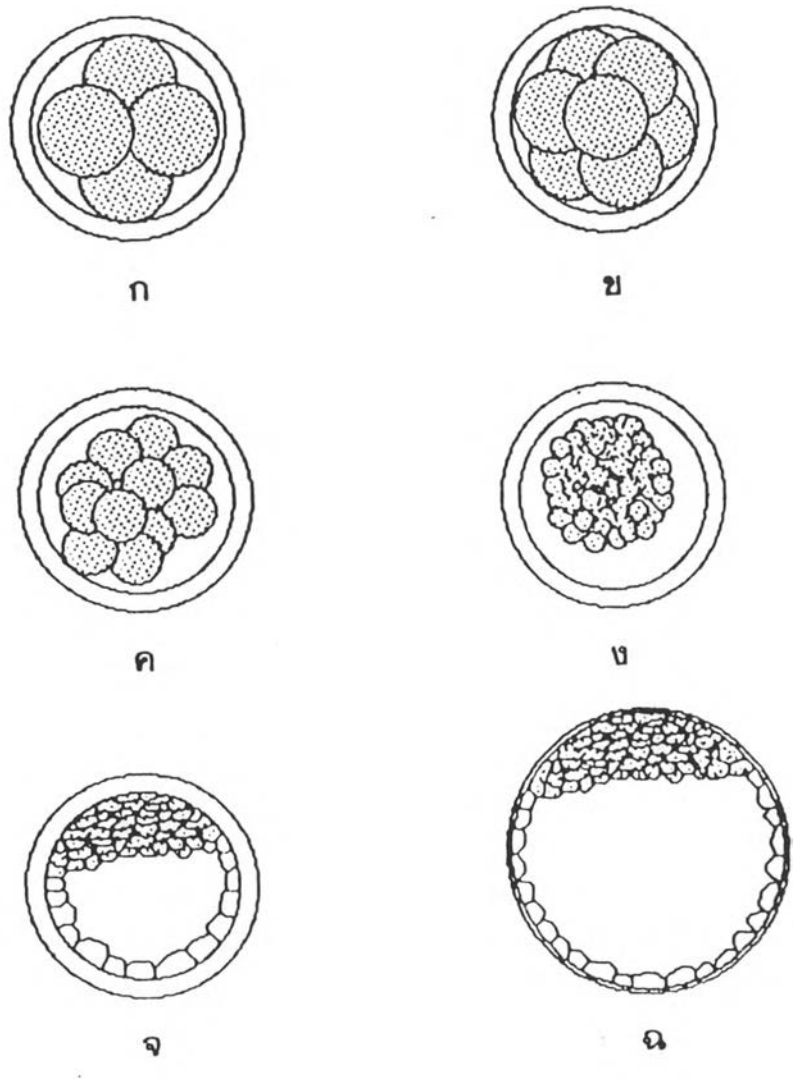
ต่อจากการศึกษาระยะแรก ๆ เหล่านี้ ก็มีการพยายามเพาะเลี้ยงเอมบริโอระยะก่อนการฝังตัวของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมอื่นๆกันอีกมาก มีการคิดค้นน้ำยาเพาะเลี้ยงเอมบริโอขึ้นมากมาย ทั้งน้ำยาเพาะเลี้ยงเอมบริโอที่เป็นเกลือแร่ธรรมดา และที่มีองค์ประกอบซับซ้อน เพื่อให้ได้น้ำยาเพาะเลี้ยงเอมบริโอที่เหมาะสมที่สุด จากการศึกษา

ของ มงคล เตชะกำพุ และคณะ (2532) ในสุกรพบว่า เอมบริโอของสุกร ระยะตั้งแต่ 2-4 เซล สามารถเจริญต่อจนถึงระยะบลาสโตซิส ในน้ำยาเพาะเลี้ยงเอมบริโอชนิดที่มีองค์ประกอบเกลือแร่ธรรมดา (simple salt medium,mKRB) ได้ดีกว่าในน้ำยาเพาะเลี้ยงเอมบริโอชนิดที่มีองค์ประกอบซับซ้อน (Complex Medium,HAM'S F-10, Flow laboratory. USA)



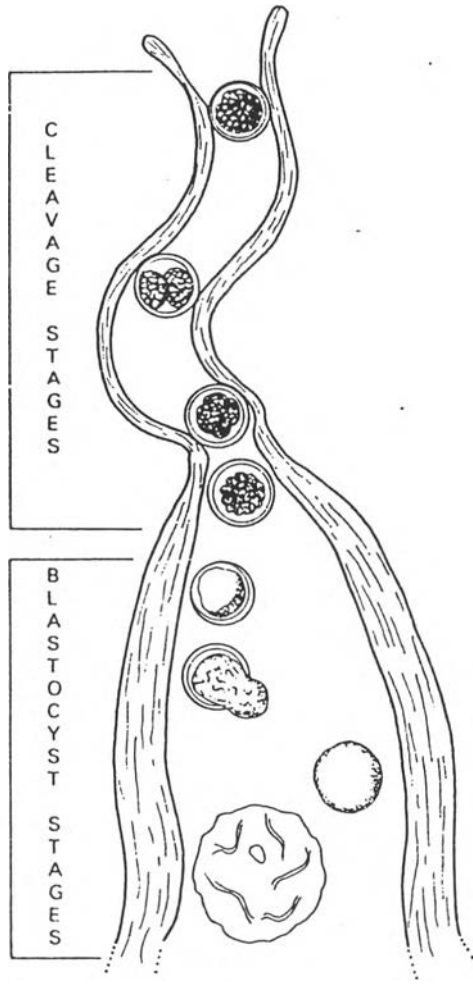
รูปที่ 1.1 ก-ค. แสดงขบวนการ compaction ของเอมบริโอ

ง. บลาสโตซิส (34-64 เซล) (Johnson and Everitt, 1988)



รูปที่ 1.2 แสดงรูปร่างลักษณะเอมบริโอในระยะต่าง ๆ

ก. ระยะ 4 เซล
ข. ระยะ 8 เซล
ค. ระยะ 16 เซล
ง. ระยะมอรูล่า
จ. ระยะบลาสโตซิส
ฉ. ระยะเอ็กซ์แพนบลาสโตซิส



รูปที่ 1.3 แสดงการเจริญของเอมบริโอระยะต่าง ๆ ในสุกร (Davis,1985)

Micromanipulation ของเอมบริโอสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม

Micromanipulation ใช้อย่างกว้างขวางมากใน embryology เซลวิทยา ทางการสัตวแพทย์และวงการแพทย์ และพันธุวิศวกรรม โดยใช้กล้องจุลทรรศน์และเครื่องมือขนาดเล็ก เพื่อการผ่าตัดเซลและโครงสร้างของเซล วิธีทาง micromanipulation ใช้บ่อยมากร่วมกับการย้ายฝากเอมบริโอและความสนใจในวิธีการนี้ก็ถูกกระตุ้นโดยการเจริญเติบโตเป็นอย่างมากของอุตสาหกรรมการย้ายฝากเอมบริโอ Robl และFirst (1985) ได้กล่าวถึงการวิธีการ manipulate ของแกมมีท (gametes) และเอมบริโอ ของสุกร Yang และAnderson (1992) ได้กล่าวถึงการวิธีการ manipulate ของแกมมีท (gametes) และเอมบริโอในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมไว้หลายวิธีเช่น

1. Microsurgical fertilization by sperm transfer เป็นวิธีการที่เกี่ยวข้องกับขบวนการนำสเปิร์มหรือนิวเคลียสของสเปิร์ม (heads) เข้าไปในโอโอพลาสสมหรือช่องว่าง perivitelline space ของ ovum ด้วยการใช้ microscope ซึ่งประกอบด้วยการฉีดสเปิร์มเข้าไปในโอโอพลาสสมโดยตรง การใส่สเปิร์มเข้าไปในช่องว่าง perivitelline space การฉีดสเปิร์มเข้าไปในชั้น subzona และวิธีการเปิดโซนาด้วยวิธีการ ต่าง ๆ เพื่อให้สเปิร์มเจาะ ovum ได้ง่ายขึ้น

2. Micromanipulation ของโซนา เพลลูซิดา โอโอไซต์หรือเอมบริโอของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมทั้งหมดจะถูกล้อมรอบโดยชั้นโซนา เพลลูซิดา ซึ่งมีหน้าที่หลายอย่าง ในบางspecies ชักนำให้เกิด acrosome reaction หลังจากสเปิร์มจับที่ zona receptors ป้องกันการเกิด polyspermic fertilizationและการป้องกันเอมบริโอถูกทำลาย วิธีการ manipulate โซนา เพลลูซิดาจะนำมาใช้เพราะ โซนา เพลลูซิดามีความเหนียวในการเลี้ยงโอโอไซต์หรือเอมบริโอภายนอกร่างกายมักจะเป็นสาเหตุให้โซนา เพลลูซิดาแข็งขึ้น ดังนั้นการ manipulate โซนา เพลลูซิดาเพื่อแก้ไขสาเหตุนี้จึงมีความสำคัญ ยกตัวอย่างเช่น การเปิดโซนา เพลลูซิดาของเอมบริโอที่เลี้ยงในหลอดทดลองของหนูและของมนุษย์ สามารถเพิ่มอัตราการ hatching และการฝังตัวของเอมบริโอได้อย่างมีนัยสำคัญ (Malter and Cohen,1989)

3. การปลูกถ่ายนิวเคลียส (nuclear transplantation) เป็นการผลิตสัตว์เหมือนกัน โดยเริ่มต้องมี nuclear donorsหรือเรียกว่า karyoplast ซึ่งได้จากเซลของเอมบริโอระยะ 4 8 16 เซล ระยะมอรูล่าหรือเซล inner cell massจากเอมบริโอระยะบลาสโตซิส โดยการแยกเซลออกเป็นเซลเดี่ยว (single cell) เซลที่แยกออกมานี้จะนำไปฝากในไซโตพลาสสมของ recipient egg ซึ่งเป็นระยะไซโกต โดยก่อนย้ายฝากต้องนำ pronucleus ทั้งชนิดเพศผู้และเพศเมียออก เรียกไข่ที่ได้จากการกระทำนี้ว่า cytoplast การทำให้นิวเคลียสของตัวให้รวมกับไซโตพลาสสมของไข่ อาศัย fusogenic agent เช่น sendai virus ซึ่งมีคุณสมบัติทำให้เซลรวมตัวกัน จากนั้นนำเอมบริโอมาเลี้ยงในน้ำยาเพาะเลี้ยงสักระยะ และนำเอมบริโอที่พัฒนาไปย้ายฝาก

4. การผลิตสัตว์ chimaera แบ่งได้เป็น 2 ประเภท

1. intraspecies chimaerism

2. interspecies chimaerism sperm injection

โดยวิธีแยกเอาเซลของเอมบริโอระยะก่อนฝังตัวเช่น 2- 4- 16- 32- เซล หรือ ระยะมอรูล่า แยกออกเป็นกลุ่ม ๆ แล้วนำมารวมกันกับเซลอีกกลุ่มหนึ่งของเอมบริโออีกพวกหนึ่ง เซลที่ได้นำมารวมกันในโซนา เพลลูซิดา โดยอาจใช้ fusogenic agent เช่น sendai virus ช่วยในการรวมตัว แล้วนำเอมบริโอที่ได้จากรวมตัวไปฝากในสัตว์ตัวรับ ส่วนอีกวิธีการหนึ่งทำโดยการฉีดเซลที่แยกได้จากเอมบริโอระยะก่อนระยะบลาสโตซิสหรือ เซล inner cell mass ของบลาสโตซิส ใส่ใน blastocel ของเอมบริโอระยะบลาสโตซิส ซึ่งวิธีการเหล่านี้สามารถผลิตสัตว์ที่มีลักษณะของสัตว์ 2 ชนิดในตัวเดียวกันได้ เช่น มีหัวและหน้าเป็นแพะ แต่มีขนแบบแกะ เรียกสัตว์ผสมนี้ว่า Geep ซึ่งจากคำว่า sheep และ goat นั่นเอง

5. Cloning by embryo splitting or embryo bisection มีความเป็นไปได้ที่การแบ่งเอมบริโอของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมในระยะต้น ๆ ออกเป็นสองส่วน หรือมากกว่าสองส่วน ซึ่งแต่ละส่วนสามารถเจริญได้อย่างอิสระ (Willadsen, 1982) ซึ่งสามารถทำให้เพิ่มผลผลิตและผลิตแฝดเหมือนของสัตว์พันธุ์ดีได้ โดยใช่วงแรก ๆ นิยมที่จะศึกษาในสัตว์ทดลองชนิดเล็กเช่นหนู และต่อมาได้ขยายมาสู่สัตว์เศรษฐกิจเช่นโค การพบว่า

การแบ่งเอมบริโอระยะมอรูล่าและบลาสโตซิสสามารถเพิ่มผลผลิตและผลิตแฝดเหมือนสัตว์ได้จำนวนมากได้กระจายไปอย่างรวดเร็ว เพราะสามารถทำได้ง่าย เอมบริโอ จะถูกแบ่งออกเป็นส่วนด้วยการใช้ใบมีด หรือเข็มแก้วปลายแหลม นำเอมบริโอที่ได้ไปเลี้ยงในน้ำยาเพาะเลี้ยง จากนั้นนำเอมบริโอที่พัฒนาไปย้ายฝาก

จากรายงานข้างต้นจะเห็นว่าการแบ่งครึ่งเอมบริโอ เป็นวิธีการหนึ่งในหลายวิธีของการ micromanipulate ของเอมบริโอ ได้ มีการรายงานความสำเร็จในการตัดแบ่งเอมบริโอตั้งแต่ ครั้งแรกเ มื่อประมาณ 40-50 ปี ในสัตว์ชนิดต่าง ๆ อาทิ เช่น หนูถีบจักร (Nicholas and Hall, 1942; Tarkowski, 1959; Tsunoda and Mclaren, 1983; Lawitts and Graves ,1988 ; Nagashima et al.,1984; Zhouji et al.,1990) จนถึงสัตว์เศรษฐกิจ เช่นโค (Willadsen et al., 1982; Williams and Moore, 1988; Seike et al., 1989; Kippax et al., 1991;) แกะ (Chesne et al., 1987) แพะ (willadsen,1980; Szell and Hudson, 1991; Shelton, 1992) สุกร (Ash et al.,1989; Reichelt and Niemann, 1994)

<u>การแบ่งเอมบริโอ</u> (Bisection of embryo)

เอมบริโอสามารถแบ่งได้เป็นผลสำเร็จ ตั้งแต่ระยะต้น ๆ (cleavage stage) จนถึงระยะมอรูล่าหรือระยะบลาสโตซิส ซึ่ง Willadsen(1982) ได้เคยอธิบายวิธีการแบ่งเอมบริโอ ในเอมบริโอระยะ ต้น ๆ ไว้อย่างละเอียด การตัดแบ่งเอมบริโอที่ระยะมอรูล่าหรือระยะบลาสโตซิส จะทำได้ยากกว่าระยะอ่อนกว่า เพราะว่าเซลของเอมบริโอจะเกาะติดกันอย่างแน่นตรงรอยต่อของแต่ละเซล เอมบริโอจะถูกแบ่งครึ่งโดยใช้ส่วนของมีดโกนขนาดเล็กๆ (fracture microblade; Baker and Shea, 1985) หรือใช้เข็มแก้วปลายแหลม (drown glass needle; Voelkel et al, 1984) จากนั้นครึ่งของเอมบริโอแต่ละส่วนสามารถเจริญเติบโตได้ด้วยตัวเอง แต่อย่างไรก็ตาม จะเห็นว่า การแบ่งครึ่งเอมบริโอในปัจจุบัน นิยมที่จะทำในระยะมอรูลาและ บลาสโตซิส (Reichelt and Niemann,1994; Seike et al,1989; Chesne et al,1987; Nagashima et al,1984; Ozil,1983; Szell and Hudson,1991; Heyman,1985; Kippax et al, 1991) ซึ่งจะเห็นว่าการแบ่งเอมบริโอทั้ง 2 ระยะนี้ ไม่ต้องการโซนา เพลลูซิดา ในการป้องกันอันตรายจาก

สิ่งแวดล้อมอีกต่อไป (Polge,1985) ดังนั้นจึงเป็นวิธีที่ง่ายและไม่เสียเวลาในการเตรียมเพลลูซิดาสำรองและนำกลับเข้าโซนาเพลลูซิดา อีกทั้งความสำเร็จของผลผลิตก็มากกว่าเอมบริโอในระยะอ่อนกว่านี้ เนื่องจากเป็นเอมบริโอระยะปลายๆ ก่อนการฝังตัว เมื่อแบ่งออกมาแล้ว จำนวนเซลเอมบริโอในแต่ละครึ่งก็มีจำนวนมาก ดังนั้น โอกาสที่จะรอดชีวิตจึงมากกว่า นอกจากนี้ เอมบริโอทั้ง 2 ระยะ ยังเก็บจากสัตว์ตัวให้และย้ายฝากให้ สัตว์ตัวรับได้โดยไม่ต้องทำการผ่าตัด ซึ่งจะเห็นว่า การแบ่งเอมบริโอทั้ง 2 ระยะ มีข้อดีและทำได้ง่ายกว่าระยะอื่นมาก

Lewis (1995) ได้เสนอแนะการแบ่งเอมบริโอเพื่อเพิ่มผลผลิตลูกหลานและเพื่อผลิตฝาแฝดเหมือนของสัตว์เศรษฐกิจพันธุ์ดี เช่น โค แพะ และแกะ ไว้เพื่อให้เกิดประโยชน์สูงสุดหลังการแบ่ง โดยได้เสนอแนะเอมบริโอที่จะนำมาแบ่งต้องคำนึงถึง

1. ระยะของเอมบริโอ เอมบริโอต้องอยู่ในระยะตั้งแต่ compact morula ขึ้น ไป โดยเฉพาะระยะบลาสโตซิสหรือระยะบลาสโตซิสปลาย ๆ เพราะว่ามีจำนวนเซลที่มีความสามารถจะมีชีวิตอยู่ต่อไปหลังการแบ่งในเอมบริโอระยะะเหล่านี้มี มาก ทำให้ครึ่งเอมบริโอมีจำนวนเซลมาก และหลังการย้ายฝากอัตราการตั้งครรภ์ก็ดีกว่าระยะอื่น

2. คุณภาพของเอมบริโอ เอมบริโอที่มีคุณภาพดีเท่านั้นจะนำมาแบ่ง การที่มีเซลหลุดออกมาไม่รวมกลุ่มทำให้คุณภาพของเอมบริโอเสื่อมลงซึ่งบ่งชี้ว่ามีเซลตายเกิดขึ้น ถ้านำมาแบ่งจะมีผลทำให้จำนวนเซลในครึ่งเอมบริโอลดลง ด้วย

Ogawa และคณะ(1983) ได้อธิบายการแบ่งเอมบริโอไว้ 2 วิธี

1.การแบ่งจากทางด้านข้าง (Lateral incision)ด้วยการใช้มีดแก้วปลายแหลมหรือมีดโลหะปลายแหลม (fine glass blade or fine metallic blade) กระทำโดยการจับเอมบริโอด้วย holding pipette ไว้ที่แขนอีกข้างของ micromanipulator ส่วนแขนอีกด้านหนึ่งจะเป็นมีดแก้วหรือมีดโลหะ โดยที่เอมบริโอและมีดต้องอยู่ด้านตรงข้ามกัน จากนั้นก็เลื่อนมีดแบ่งเอมบริโอออกเป็นสองส่วนโดยการแทงจากทางด้านข้างเอมบริโอครึ่งเอมบริโอที่ได้ ทั้งสองส่วนยังอยู่ในโซนา เพลลูซิดา (รูปที่1.4)

2. การแบ่งเอมบริโอโดยใช้เข็มโลหะ (metallic microneedle) โดยก่อนการแบ่งต้องมีการทำให้ โซนา เพลลูซิดานิ่มด้วยการ incubate เอมบริโอใน pronase ทำการแบ่งเอมบริโอโดย ตำแหน่งของเข็มจะอยู่เหนือเอมบริโอ เอมบริโอจะถูกจับไว้ด้วย holding pipette จากนั้นเข็มจะถูกเลื่อนลงมาตัดตรงกลางเอมบริโอไปที่พื้นของ petri dish (รูปที่ 1.5)

นอกจากวิธีการแบ่งครึ่งเอมบริโอ ที่ Ogawa และคณะได้รายงานไว้นี้แล้วก็ยังมีวิธีการอื่น ๆ อีก เช่น การแบ่งโดยใช้ใบมีดโดยที่ทำการยึดเอมบริโอไว้กับ petri dish ด้วยการทำรอยขูดที่ก้น petri dish จากนั้นก็ทำการแบ่งเอมบริโอจากบนลงล่าง (Reichelt and Niemann,1994) นอกจากนี้การแบ่งเอมบริโอด้วยเข็มแก้วสองอันที่อยู่ด้านตรงข้ามกัน วางเข็มแก้วขนานกันแล้วกดเข็มแก้วลงที่เอมบริโอจากนั้นแยกเข็มแก้วออกจาก (Nagashima at al.,1989) จะได้ครึ่งเอมบริโอสองส่วนก็เคยรายงานไว้เช่นกัน

<u>ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการแบ่งเอมบริโอ</u>

การเจริญของเอมบริโอหลังถูกแบ่งแล้วขึ้นอยู่กับ

1.จำนวนเซล พบว่า การเจริญของเอมบริโอเป็นระยะบลาสโตซิส หรือเจริญเป็นตัวเต็มวัย ต้องประกอบไปด้วยเซลจำนวนหนึ่ง หากเซลดังกล่าวแบ่งออกมาแล้วจำนวนไม่พอ เอมบริโอจะไม่เจริญเป็นบลาสโตซิส จะเป็นเพียง trophoblastic vesicle ที่มีเฉพาะเซล trophoblast เท่านั้น ไม่มี inner cell mass เลย ดังนั้นการแบ่งเอมบริโอจึงไม่สามารถทำได้อย่างไม่มีขอบเขต เช่น เอมบริโอในระยะมอรูล่า ไม่สามารถแบ่งเป็นส่วนย่อย ๆ ได้แล้วเจริญเป็นตัวเต็มวัยตามจำนวนเซลที่แบ่งได้ และที่ระยะบลาสโตซิส (blastulation) สัตว์แต่ละ species จะมีจำนวนเซล ไม่เท่ากัน เช่น ของหนูถีบจักร ระยะบลาสโตซิส จะเกิดหลังจากมีการการแบ่งเซลที่ระยะ cleavage (cleavage division) 5 ครั้ง ในกระต่ายจะผ่านถึง 7 ครั้ง ส่วนแพะและโคจะผ่าน 6 ครั้ง ดังนั้นที่

เวลาของระยะบลาสโตซิส จำนวนเซลของหนูถีบจักร กระต่าย แพะและโค ประมาณ 32, 128 และ 64 เซลตามลำดับ (Willadsen, 1982)

2.แนวการแบ่ง การแบ่งเอมบริโอจะเป็นแนวไหนก็ได้จนถึงระยะ มอรูล่าถ้าจะแบ่งในระยะบลาสโตซิสแล้ว การแบ่งต้องมีส่วนของ inner cell mass เท่า ๆ กัน การแบ่งที่ไม่สมดุลย์ (asymmetry) สามารถทำให้เกิดความผิดปกติของลูกอ่อนได้ Ozil (1983) พบสภาพของ fetal monster (Acerdiacus amorphus) มีลักษณะเป็น embryonic mass มีขนอยู่รอบ ๆ ก้อนเนื้อ โดยไม่มีลักษณะของอวัยวะร่างกายเลย ออกมาพร้อม ๆ กับลูกโคที่สมบูรณ์ ดังนั้นการแบ่งเอมบริโอระยะบลาสโตซิส (Blastocyst) จึงต้องคำนึงถึง inner cell mass และ trophoblast cell ในแต่ละครั้งด้วย

3.โซนาเพลลูซิดา โซนาเพลลูซิดาของเอมบริโอมีความสำคัญต่อ การเจริญเติบโตของเอมบริโอ โดยเฉพาะก่อน compact morula ดังนั้น หากมีการย้ายฝากครั้งเอมบริโอที่ไม่มีชั้น โซนาเพลลูซิดา หุ้มในระยะก่อนหน้านี้ ทิ้งไว้ในโพรงมดลูก 3 วัน จะเกิดการเสื่อมของเอมบริโอ และไม่สามารถเก็บได้ หลังชะล้างออกมา ความสำคัญของชั้น โซนาเพลลูซิดา จะลดลงเมื่อเอมบริโอเข้าสู่ระยะ compact morula โดยเมื่อแบ่งครั้งแล้ว ไม่จำเป็นต้องใส่เปลือก โซนาเพลลูซิดา หรือนักวิจัยบางท่านทำการแบ่งครั้งผ่านชั้น โซนาเพลลูซิดา เลยก็ได้ อย่างไรก็ตาม โซนาเพลลูซิดา ในทางธรรมชาติมีหน้าที่ 2 อย่างคือ (Johnson and Everitt, 1988) ป้องกันเซลของเอมบริโอถูกทำลายออกเป็นชิ้น ๆ ระหว่างที่เอมบริโอยังอ่อน (early cleavage) ก่อนที่เซลจะมีการเกาะแน่นและป้องกันสิ่งแปลกปลอมเข้ามาทำลายเซล อาทิเช่น เชื้อโรค ต่างๆ สารพิษ เป็นต้น

4. คุณภาพของครั้งเอมบริโอ คุณภาพของครั้งเอมบริโอหลังการแบ่งแล้วมีส่วนสำคัญต่ออัตราการรอดชีวิตเพราะพบว่ามีส่วนสัมพันธ์กับจำนวนเซล โดยถ้าหากมีการสูญเสียเซลมากคุณภาพของครั้งเอมบริโอจะลดต่ำลง อัตราการรอดชีวิตจะลดน้อยลง (Tao et al., 1995)

คุณภาพของเอมบริโอ มีส่วนสำคัญต่ออัตราการรอดชีวิตของเอมบริโอหลังการย้ายฝาก เอมบริโอที่มีลักษณะรูปร่างที่ดี จะให้อัตราความสำเร็จที่สูง ในขณะที่เอมบริโอผิดปกติ จะให้ผลต่ออัตราการตั้งท้องต่ำหรือไม่ติดเลย (Elsden et al; 1978)

ดังนั้นในอุตสาหกรรมการย้ายฝากเอมบริโอ จึงนิยมใช้เอมบริโอ ที่มีคุณภาพดีขึ้นไปเท่านั้น นอกจากนี้การแบ่งครึ่งเอมบริโอ เพื่อเพิ่มผลผลิต หรือผลิตแฝดเหมือน ก็นิยมใช้เอมบริโอที่มีคุณภาพดีเช่นกัน การประเมินคุณภาพเอมบริโอเป็นขั้นตอนที่สำคัญขั้นตอนหนึ่ง ซึ่งการประเมินโดยดูจากรูปร่างของเอมบริโอเป็นอีกวิธีการหนึ่งที่ใช้กันเป็นประจำ มงคล (2534) ได้แบ่งเกรดเอมบริโอไว้ดังนี้

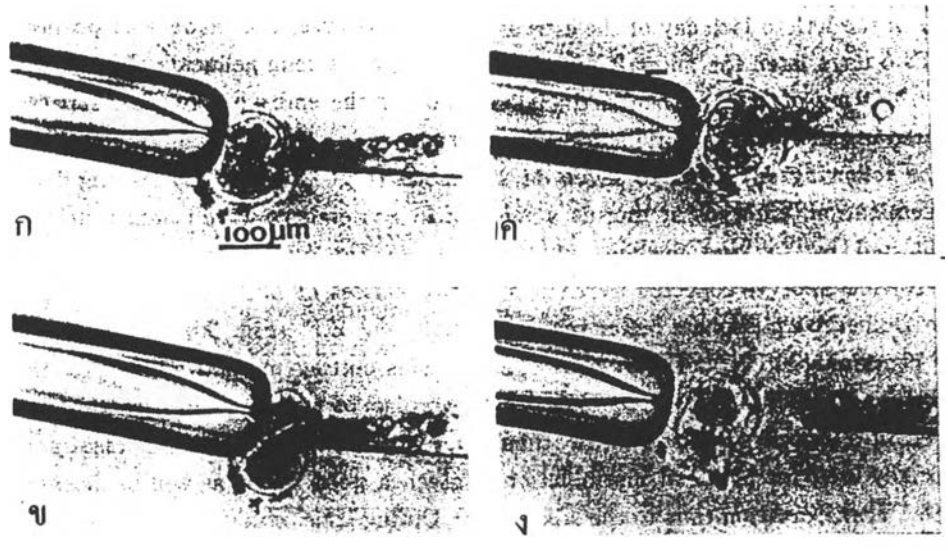
เอมบริโออาจแบ่งเป็น 4 เกรด ตามลักษณะ gross morphology ดังนี้

ดีมาก (Excellent) = ideal embryo กลม มีการแบ่งเซลอย่างสม่ำเสมอ มีสีกลมกลืนเป็นสีเดียวกัน

ดี (Good) = มีตำหนิเล็กน้อย เช่น อาจมีบางเซลหลุดมาที่ผิว หรือรูปร่างไม่สม่ำเสมอ (irregular shape) หรือมี vesiculisation จำนวนเล็กน้อยอยู่รอบๆ

พอใช้ (Fair) = มีตำหนิมากยิ่งขึ้น แต่ไม่รุนแรง โดยมีเซลหลุด (extruded blastomeres) ออกมาก และพบเซลเสื่อมสลาย

เลว (Poor) = มีตำหนิมาก โดยพบเซลที่หลุดออกมา (extruded blastomeres) มาก มีเซลเสื่อมสลายและเซลมีขนาดต่าง ๆ กัน มี vesiculisation จำนวนมาก



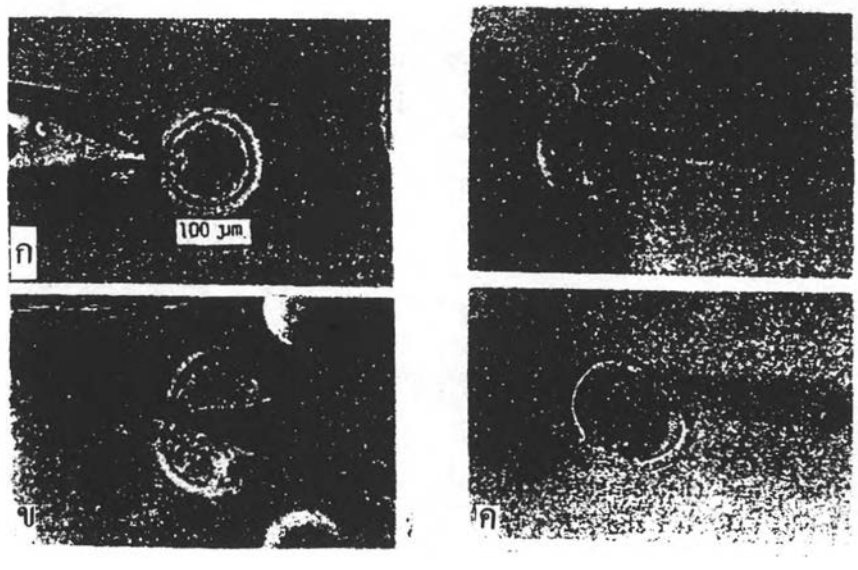
รูปที่ 1.4 การแบ่งครึ่งเอมบริโอด้วยมีดแก้ว โดยการแทงมีดเข้าทางด้านข้างของเอมบริโอ

ก. ใช้มีดแทงเอมบริโอจากทางด้านข้าง

ข. แทงมีดไปข้างหน้าผ่าน โซนา เพลลูซิดา ใบมีดแบ่งเอมบริโอเป็นสองส่วน

ค. เอมบริโอจะยึดไว้โดยแรงดูดจาก holding pipette

ง. หลังจากเอามีดออก ครึ่งเอมบริโอยังอยู่ใน โซนา เพลลูซิดา



รูปที่ 1.5 แสดงการแบ่งครึ่งเอมบริโอโดยใช้เข็มโลหะ โดยการใช้เข็มแบ่งครึ่งเอมบริโอจากแนวบนมาล่าง (มองจาก ด้านบน)

ก. เอมบริโอถูกจับด้วย holdind pipette

ข. ส่วนปลายของเข็มแตะกับ petri dish

ค. ช่องว่างระหว่างครึ่งเอมบริโอจะกระทำโดยใช้เข็มถูไปมา ตำแหน่งลูกศรชี้เป็นเงาของ holding pipette และเข็มหลังจากถอนออกไป

การแบ่งเกรดครึ่งเอมบริโอ

Nagashima และคณะ (1989) ได้ศึกษาการเจริญของครึ่งเอมบริโอระยะมอรูล่าและระยะบลาสโตซิส ภายหลังการเลี้ยงไว้ 24 ชม. ได้แบ่งเกรดครึ่งเอมบริโอหลังการเลี้ยงโดยดูจากรูปร่าง (morphological criteria) แบ่งเป็น 3 กลุ่มดังนี้

กลุ่ม 1. excellent เป็นเอมบริโอระยะบลาสโตซิส ที่มีการเสื่อมสลายของเซลเล็กน้อย (10%) และเห็น inner cell mass อย่างชัดเจน

กลุ่ม 2. Fair เป็นเอมบริโอระยะ บลาสโตซิส ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางเล็กกว่ากลุ่มที่ 1 มีการเสื่อมสลายของเซลมากกว่า(10-20%) และเห็น inner cell mass ไม่ชัดเจน

กลุ่ม 3. degenerated เป็นเอมบริโอระยะบลาสโตซิส เล็กๆ มีการเสื่อมสลายของเซลมาก (>20%) หรือ blastomere แตกกระจาย (non integrated blastomere) และไม่มี inner cell mass

แม้ว่าการผลิตแฝดเหมือนหรือการเพิ่มผลผลิตของสัตว์เศรษฐกิจจากการแบ่งครึ่งเอมบริโอจะทำกันอย่างกว้างขวางในต่างประเทศ แต่อย่างไรก็ตามในประเทศไทยยังมีการศึกษาน้อย วิทยานิพนธ์นี้ได้ศึกษาการแบ่งเอมบริโอในระยะมอรูล่า และบลาสโตซิสเนื่องจากว่ามีความสะดวกและทำได้ง่ายกว่าระยะอ่อนกว่าดังที่ได้กล่าวมาแล้ว โดยใช้เข็มแก้วและใบมีดเพื่อศึกษาและพัฒนาวิธีการแบ่ง ตลอดจนระยะของเอมบริโอที่เหมาะสมในการแบ่ง ทั้งนี้เพื่อการนำเทคนิคที่เหมาะสมไปใช้ประโยชน์ ทั้งในด้านวิชาการและด้านเศรษฐกิจต่อไป โดยได้เลือกสุกรเป็นสัตว์ทดลอง ซึ่งผู้วิจัยหวังว่าน่าจะเป็นตัวแทนของสัตว์เศรษฐกิจชนิดอื่นได้ดี เนื่องจากสุกรเป็นสัตว์เศรษฐกิจที่มีการตกไข่ในแต่ละครั้งจำนวนมากเมื่อเทียบกับชนิดอื่น ดังนั้นจึงผลิตเอมบริโอได้พอเพียงในการทดลองแต่ละครั้ง เอมบริโอยังมีขนาดใกล้เคียงกับสัตว์เศรษฐกิจชนิดอื่น นอกจากนี้การแบ่งครึ่งเอมบริโอสุกรในประเทศไทยยังไม่เคยมีรายงานไว้ ซึ่งอาจกล่าวได้ว่าวิธีการเหล่านี้เหมาะสมต่อการนำไปปฏิบัติจริงในฟาร์ม และสามารถนำไปพัฒนาเพื่อการแบ่งครึ่งและถ่ายฝากเอมบริโอ ในสัตว์เศรษฐกิจชนิดอื่น เช่นโคและกระบือ เป็นต้น

วัตถุประสงค์

1. เพื่อเปรียบเทียบความสำเร็จในการแบ่งครึ่งเอมบริโอ จากเอมบริโอระยะมอรูล่าและบลาสโตซิส

2. เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของใบมีดและเข็มแก้วในการแบ่งครึ่งเอมบริโอ

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้เทคนิควิธีการแบ่งเอมบริโอ

2. ได้ฐานข้อมูลในการแบ่งเอมบริโอในระยะต่าง ๆ กัน

3. ได้วิธีการและระยะของเอมบริโอที่เหมาะสมที่จะนำมาแบ่งครึ่ง

4. เพิ่มจำนวนผลผลิตจากเอมบริโอใบเดียวกันเพื่อประโยชน์ทางวิชาการและทางเศรษฐกิจ

5. นำไปปรับใช้กับเอมบริโอของสัตว์ชนิดอื่น ๆ